Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 589-601

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۶۰۱-۵۸۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Detection of Salmonella spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method

Kobra Tajik Toughan[1], Mohammadreza Edalatian Dowom[2*], Seyed Ali Mortazavi[3], Ali Javadmanesh[4]

Received: 2021.12.13
Revised: 2022.01.28
Accepted: 2022.02.06
Available Online: 2022.02.06

How to cite this article:
Tajik Toughan, K., Edalatian Dowom, M. Mortazavi, S. A. Javadmanesh, A. (2022). Detection of Salmonella spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 589-601.

Abstract

Introduction: Poultry and meat products are the largest sources of non-typhoid salmonella infections in most countries. Studies have shown that raw foods of animal origin, especially poultry and its products, are the main source of contamination of kitchens and restaurants. In terms of growth conditions, these microorganisms are resilient bacteria and easily adapt to their environmental conditions. Salmonella has been known to cause intestinal disease for many years and has been reported as the most important cause of food poisoning. According to Iranian and international standards, there should be no *S. enteritidis* or *S. typhimurium* in 25 grams of food. DNA-based methods for the identification and differentiation of Salmonella serovars have been designed and applied using specific primers at the genus and serovar levels. Therefore, they can be used as useful and rapid screening tests, as well as to supplement or replace conventional biochemical and serological tests. Real-time PCR, with the most accurate and reliable results using a fluorescence probe, which of course has a high cost. In this method, sequence specific fluorescence probes are used, and as a result, in the target molecule, screening and determination the presence or even the concentration of specific sequences is possible. Therefore, even in the presence of other types of nucleic acid molecules, the results are obtained quickly and have a high level of specificity. Under these conditions, if specific probes with different florescence dyes are used, even multiple targets can be detected in a single PCR reaction. The aim of this study was to identify *S. enteritidis* or *S. typhimurium* by PCR and Salmonella spp. by real time PCR method in poultry products.

Material and Method: In total, 45 samples of poultry products, including chicken breast, liver and gizzard (15 samples each) were purchased from different regions of Mashhad and from various companies and transferred to the laboratory in accordance with hygienic standards. For each sample, 25 g of tissue was isolated and homogenized under sterile conditions and DNA extraction was then performed using a DNA extraction kit. The extracted DNA was evaluated by agarose gel electrophoresis. The purity and quantity of DNA extracted from each sample was examined by spectrophotometry method. In the next step, in order to identify the genus Salmonella, the samples were examined by real time PCR. In this method we used an internal control to ensure that negative results are not false negative due to inhibitors. The results of real time PCR showed that out of 45 samples, nine samples were infected with Salmonella. Then, these nine samples were evaluated for *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* infection by conventional PCR method.

1. Graduated MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Corresponding Author: edalatian@um.ac.ir
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
4. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
(*Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74447.1129

Result and Discussion: The results showed that out of nine samples that were positive in real time PCR test, seven samples were contaminated with *Salmonella typhimurium*, of which five samples were related to chicken breast and two to liver. Regarding *Salmonella enteritidis* infection, out of nine samples, only one sample was contaminated, which was related to chicken breast. Conventional methods have been traditionally used to enumerate target bacteria in food. However, these methods have some limitations and require considerable time and labor. Previous studies have already shown that real time PCR is more effective than conventional bacteriological methods for the detection of Salmonella spp. In a study by Whyte et al. (2002) The presence of Salmonella was assessed by traditional culture methods and by a Salmonella-specific polymerase chain reaction (PCR) test. Salmonella was recovered from 16% of samples using traditional culture methods. In contrast, the PCR assay proved to be more sensitive and detected Salmonella DNA in 19% of the examined samples (Whyte et al. 2002). Results of PCR with specific primers showed that reactions in real time PCR with general primers of Salmonella spp. were done correctly. Despite of accuracy and speed of real time PCR to detect DNA of microorganisms, further studies are developed to have more advantages. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) showed a higher sensitivity of Salmonella detection in compare to qPCR (Vichaibun & Kanchanaphum, 2020). Although LAMP could detect trace amount of Salmonella DNA but primer design for this reaction is very difficult. However, it is important to highlight that non-viable cells can be detected by real time PCR or other DNA-based methods, which does not occur in traditional methods of culture and isolation that require viable cells for quantification (Zeng et al., 2016).

Keywords: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, Chicken breast, Real time PCR.

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۶۰۱-۵۸۹

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 589-601

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های خام مرغ با استفاده از کاوشگر اختصاصی به کمک روش Real Time PCR

کبری تاجیک طوغان[۱]- محمدرضا عدالتیان دوم[۲]*- سید علی مرتضوی[۳]- علی جوادمنش[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های مرغ با تکیه بر روش Real time PCR است. بدین منظور، تعداد ۴۵ نمونه از فرآورده های ماکیان که شامل سینه، کبد و سنگدان مرغ بودند از نقاط مختلف شهر مشهد و از شرکت‌های گوناگون خریداری و با رعایت موازین بهداشتی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. طبق استانداردهای ایران و بین‌المللی، در ۲۵ گرم از ماده غذایی، نباید هیچ سالمونلایی وجود داشته باشد. بدین منظور، ۲۵ گرم از هر یک از نمونه ها جدا شده و تحت شرایط استریل به‌خوبی هموژن شدند و استخراج DNA صورت گرفت. به‌منظور تایید، DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. خلوص و کمیت DNA استخراج شده هر یک از نمونه‌ها توسط طیف‌سنجی نوری مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد به‌منظور شناسایی جنس سالمونلا، نمونه‌ها توسط روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که از مجموع ۴۵ نمونه، ۹ نمونه آلوده به جنس سالمونلا می‌باشد. سپس این ۹ نمونه، از نظر آلودگی به گونه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* مورد ارزیابی قرار گرفتند که برای این منظور از روش PCR معمولی استفاده شد. نتایج نشان داد از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به سالمونلا تیفی موریوم بوده که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به سینه مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد بود و از نظر آلودگی به *سالمونلا انتریتیدیس* از تعداد ۹ نمونه، تنها یک نمونه آلوده بود که مربوط به سینه مرغ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس*، گوشت مرغ، Real Time PCR.

مقدمه

مرغ و فراورده‌های گوشتی بزرگترین منابع عفونت‌های سالمونلایی غیرتیفوئیدی در اکثر کشورهای دنیا می‌باشند. مطالعات نشان داده که مواد غذایی خام با منشأ دامی به‌ویژه طیور و فراورده‌های آن منبع اصلی آلودگی آشپزخانه ها و رستوران‌ها است (Mortazavi et al., 1993؛ Le Minor, 1981). باکتری‌های جنس سالمونلا گرم منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، باسیلی شکل به اندازه ۵- ۲× ۱/۵- ۰/۷ میکرون هستند که خصوصیات عمومی خانواده انتروباکتریاسه را دارا می‌باشند. از لحاظ شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها باکتری‌های انعطاف‌پذیری بوده و به آسانی با شرایط محیطی خود را هماهنگ می‌کنند.

سالمونلوز یکی از شایع ترین بیماری عفونی با منشا مواد غذایی در جهان می باشد که در اکثر نقاط مختلف دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه از اهمیت ویژهای برخوردار است (Azizpour and Ghazaei, 2019). سالمونلاها سالهاست که عامل بیماری روده‌ای شناخته شده‌اند و به‌عنوان مهمترین عامل مسمومیت غذایی قابل گزارش مطرح هستند (Alcamo, 1997). در میان این سروتیپ‌ها، سروتیپ *سالمونلا تیفی‌موریوم*[۵] متداولترین عامل سالمونلوز در انسان می‌باشد اما این احتمال وجود دارد که در آینده نزدیک این نسبت به نفع *سالمونلا انتریتیدیس*[۶] تغییر کند. چرا که عفونت‌های ناشی از این باکتری در اکثر کشورهای جهان رو به افزایش است. شواهد موجود نشان می‌دهد که مصرف تخم‌مرغ و گوشت مرغ آلوده با *سالمونلا*

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب‌دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: edalatian@um.ac.ir
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74447.1129
5 *S.typhimurium*
6 *S.enteritidis*

انتریتیدیس عامل اصلی این افزایش می‌باشد (Liljebjelke et al., 2005). در سال ۲۰۱۳، ۸۲۶۹۴ مورد سالمونلوسیس در اروپا بر اساس آمار و اطلاعات مرکز کنترل و پیشگیری بیماری اروپا (ECDC[1]) گزارش شد. بر اساس گزارش اخیر، *سالمونلا انتریکا* زیرگونه انتریکا سرووار *انتریتیدیس* و *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا* سرووار تیفی موریوم بیشترین گونه های گزارش شده بودند که به‌ترتیب ۳۹/۵٪ و ۲۰/۲٪ را به‌خود اختصاص داده بودند (EFSA & ECDC, 2015). در سال ۲۰۱۱ ، قوانین اتحادیه اروپا، ۲۰۷۳/۲۰۰۵ ، (EC, 2005) اصلاح شد. بدین صورت که معیار عدم وجود گونه های سالمونلا در ۲۵ گرم از گوشت تازه ماکیان به‌وسیله معیار عدم وجود *S. Enteritidis* و *S. Typhimurium* در ۲۵ گرم از گوشت تازه ماکیان "جایگزین شد. روش های تکثیر DNA برای شناسایی و افتراق سرووارهای سالمونلا، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس و سرووار طراحی شده و مورد مطالعه گرفته اند. از جمله سرووارهای مهم سالمونلا، *سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا پلوروم، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا دابلین* می باشد. تکنیک های تکثیرDNA بر روی نواحی ژنومیک اختصاصی سرووارهای سالمونلا، قادر به شناسایی و تفریق سرووارهای بالینی سالمونلا مهم می باشند، بنابراین می‌توان از آن‌ها به‌عنوان آزمایش‌های مفید و سریع غربالگری و نیز در جهت تکمیل و یا جایگزین آزمایش‌های بیوشیمیایی وسرولوژیکی استفاده نمود (Bejai Al-Zhaibi et al., 2019).

Rad و همکاران (۲۰۰۸) شناسایی گونه‌های مختلف سالمونلا در مرکز اصلاح و پرورش مرغ بومی را مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌هایی از بخش‌های مختلف سالن مرغ مادر، سالن جوجه‌کشی، سالن جوجه های زیر یک هفته و نیز از تخم‌مرغ جمع‌آوری گردید. درصد آلودگی به سالمونلا در ۴ سالن مرغ مادر ۶۴/۱ درصد و در زرده تخم‌مرغ‌ها و نیز پوسته ۹۲/۱ درصد بود. از نمونه‌های مربوط به سالن جوجه‌کشی و سالن جوجه‌های زیر یک هفته، باکتری سالمونلا جدا نشد. در مجموع تعداد ۷ نمونه آلوده به سالمونلا بوده و تمام این نمونه‌ها متعلق به گروه Dبودند. آزمایش PCR برای تایید تشخیص جنس سالمونلا و نیز تعیین گونه صورت گرفت. تمام گونه‌ها به‌عنوان S. *enteritidis* تشخیص داده شدند (Rad et al., 2008).

Moghadam و همکاران (۲۰۱۷) به شناسایی و بررسی سروتیپ های *سالمونلا تیفی موریوم، اینفنتیس* و *انتریتیدیس* در نمونه‌های بالینی از مراکز درمانی سطح استان کرمان پرداختند. با استفاده از روش PCR حضور جنس سالمونلا با تکثیر ژن *invA* در۱۳۰ نمونه از ۱۳۲ نمونه تأیید شده سالمونلا باروش‌های میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی (۹۸ درصد) تأیید گردید. همچنین نتایج نشان‌دهنده شیوع ۱۹ درصدی *سالمونلا اینفنتیس*، ۲۲ درصدی *سالمونلا تیفی موریوم* و۳۲ درصدی *سالمونلاانتریتیدیس* بود (Moghadam et al., 2017).

تکنیک Real-time PCR، دقیق‌ترین و قابل اعتمادترین نتایج با استفاده از کاوشگر فلورسانس به‌دست می‌آید که البته هزینه زیادی نیز دارد. در این روش از کاوشگرهای DNA یا RNA اختصاصی استفاده می‌شود و در نتیجه در مولکول هدف، جستجو و تعیین غلظت برای توالی‌های خاص امکان پذیر می‌گردد. بنابراین حتی در حضور سایر انواع مولکول های اسید نوکلییک، نتایج حاصل از نظر اختصاصی بودن، در حد بالایی است. در این شرایط، چنانچه از کاوشگرهای اختصاصی با رنگ‌های مختلف استفاده شود، حتی می‌توان ژن های متعددی را در یک واکنش PCR، مورد بررسی قرار داد (Navarro et al., 2015).

Morsali و همکاران (۲۰۱۷) به‌منظور بهینه‌سازی و تشخیص همزمان سالمونلا و اشرشیا در فرآورده‌های گوشتی و بررسی میزان آلودگی آنها با روش PCR چندگانه[2] تحقیقاتی انجام دادند. تعداد ۷۴ نمونه گوشت به‌طور تصادفی از نواحی مختلف استان زنجان جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد که از بین ۷۴ نمونه گوشتی، تعداد ۶ نمونه به اشرشیا، تعداد ۴ نمونه به سالمونلا و تعداد ۲ نمونه به هر دو باکتری آلوده بودند. آزمایش PCR چندگانه در تشخیص همزمان هر دو پاتوژن در کمترین رقت تلقیح شده به نمونه‌های گوشتی نیز از حساسیت بالایی برخوردار بود. در این مطالعه آزمایش PCR چندگانه بر اساس ژن های بیماری‌زایی سالمونلا و اشرشیا جهت تشخیص سریع و همزمان این پاتوژن‌ها با حساسیت و اختصاصیت بالا بهینه سازی شد. واکنش PCR چندگانه به‌منظور شناسایی همزمان پاتوژن های انتقال یافته از راه غذا در کنترل آلودگی‌های مواد غذایی روش قابل اعتمادی است (Morsali et al., 2017). Cheng و همکاران (۲۰۰۸) توسط روش Real- PCR time به شناسایی سالمونلا در نمونه‌های مختلف غذایی از جمله: غذاهای خشک و غذاهای دریایی پرداختند. برای این منظور ۴۲۰ نمونه تهیه شد و پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، شناسایی سالمونلا توسط Real-time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که ۳۷ نمونه از ۴۲۰ نمونه آلوده به سالمونلا می‌باشد (Cheng et al., 2008). Siala و همکاران (۲۰۱۷) توسط روش Real-time PCR به شناسایی سالمونلا در نمونه‌های مختلف غذایی پرداختند.۵۰۰ نمونه غذا به‌طور تصادفی از سوپرمارکت های مختلف طی ۴ ماه جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها شامل: غذاهای پخته شده، شیر، محصولات لبنی، میوه‌های تازه و سبزیجات، غذاهای دریایی، گوشت خام مرغ، انواع کیک ها می‌باشند. نتایج نشان داد که ۲۵ نمونه (۵ درصد) از آنها آلوده به سالمونلا بودند. گونه‌های سالمونلا در گوشت خام مرغ ۲۷/۴۵ (۶۰ درصد)، شیر ۳۱/۹۳ (۳۳/۳ درصد)، گوشت قرمز خام ۵/۱۳ (۳۸/۵ درصد) و ماهی ۱۱/۴۶ (۹/۲۳

1 European Centre for Disease Prevention and Control

2 Multiplex PCR

درصد) بود. همچنین شیوع بیماری سالمونلا در کیک، لبنیات، غذاهای پخته، به‌ترتیب ۱۱/۱۴ (۸/۲۶ درصد)، ۲۲/۵ (۲۲/۷ درصد) و ۳۲/۱۵ (۲۱/۳ درصد) در مقایسه با روش کشت بود (Siala et al., 2017).

روش های مولکولی متعددی بر پایه کشف DNA سالمونلا، (برای مثال ژن *inv A*) توسعه پیدا کرده‌اند (McGuinness et al., 2010). تکنیک و روش Real-time PCR سریع‌تر و حساس‌تر از روش PCR قراردادی[1] و داده‌های در زمان واقعی[2] و بدون استفاده از ژل الکتروفورز برای ما فراهم می‌نماید (Apfalter et al., 2003). ژن‌ها و قطعات هدف مختلفی برای شناسایی و کشف سالمونلا در مواد غذایی استفاده شده است و ژن *inv A* متداول‌ترین ژن مورد استفاده بوده است (Chen et al., 2011). ژن *inv A* کاندیدای خوبی برای کشف و شناسایی سالمونلا می‌باشد و در تمام سرووارهای (سروتیپ‌های) توصیف شده تا به‌حال وجود داشته است (Boyd et al., 1997). علاوه بر آن، محصول این ژن برای توانایی این ارگانیسم جهت تهاجم به سلول‌های پستانداران و ایجاد بیماری لازم و ضروری است (Galán & Curtiss, 1991).

در این پژوهش، بر روی فراورده‌های خام ماکیان (اعم از گوشت، کبد و سنگدان مرغ) تحقیقاتی در جهت شناسایی و کشف باکتری‌های جنس سالمونلا به کمک روش‌های مولکولی، انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده، به روش مولکولی Real Time PCR به‌منظور تایید نهایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. هدف از این مطالعه شناسایی باکتری سالمونلا از محصولات و فراورده‌های گوشت ماکیان و تایید تشخیص آن با استفاده از روش ملکولی Real Time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

باکتری‌های *سالمونلا اینتریتیدیس* (PTCC 1735) و *سالمونلا تایفی موریوم* (PTCC1709) به‌عنوان کنترل مثبت تست‌ها، از آزمایشگاه بیوتکنولوژی مولکولی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی تهیه شد. به‌منظور فعال‌سازی، باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی محیط کشت اختصاصی سالمونلا- شیگلا آگار (Salmonella-Shigella Agar) (Saroj et al., 2008) و باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* بر روی محیط کشت اختصاصی Brain Heart Infusion Agar (BHI) آگارکشت داده شدند (Momtaz et al., 2014). برای آماده‌سازی به‌منظور استخراج DNA هر دو باکتری به‌طور جداگانه به محیط کشت مولر هینتون براث (MUELLER-HINTON broth) انتقال داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد (Monadi et al., 2013).

نمونه‌برداری از بافت‌های حیوانی

تعداد ۴۵ نمونه که شامل بافت سینه مرغ، کبد مرغ و سنگدان مرغ می‌باشد از مراکز فروش مختلف، و از برندهای گوناگون اعم از (یادگار، مک توس، کاکلی، آریا پروتئین، پاک، رضوان، سپید گوشت) از شهر مشهد جمع‌آوری شدند و با رعایت موازین بهداشتی به آزمایشگاه منتقل شدند. در مرحله بعد مقدار ۲۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها جدا شده و توسط هاون و بوته چینی به‌خوبی هموژن شد.

استخراج DNA از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس*

بدین منظور از کیت استخراج DNA (High Pure PCR Template Preparation، شرکت Roche، آلمان) براساس دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد.

استخراج DNA از بافت

برای استخراج DNA از بافت، در این پژوهش از کیت استخراج DNA از بافت (Tissue DNA (Extraction kit شرکت پارس توس استفاده شد.

ارزیابی DNA استخراج شده

به‌منظور بررسی وجود شکستگی در DNA استخراج شده از نمونه ها، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و خلوص و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش Real time PCR

برای فعال‌سازی کنترل مثبت ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق‌کننده به ویال حاوی کنترل مثبت اضافه شد و به‌منظور فعال سازی کنترل منفی ۵ میکرولیتر از بافر رقیق‌کننده به ویال کنترل منفی نیز اضافه شد. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. محتویات ویال حاوی مستر میکس PCR با محتویات ویال حاوی PCR Assay مخلوط شده و ۵ میکرولیتر از آن به همه میکروتیوب‌ها اضافه شد. در مرحله بعد به جز میکروتیوب حاوی کنترل مثبت ۳ میکرولیتر آب به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه شد. سپس ۲ میکرولیتر از هر یک از DNA نمونه ها به میکروتیوب ها اضافه شد (جدول ۱). این مراحل در ۴۰ سیکل

1 Conventional PCR

2 Real- time

انجام شد. ارزیابی محصولات واکنش Real time PCR طبق راهنمای کیت، بر اساس مشاهده سیگنال فلوئوروسانس انجام گرفت.

جدول ۱- مواد و حجم استفاده شده در واکنش Real time PCR

Table 1- Reagents and volume used in Real time PCR reaction

Component	Sample	Positive PCR Control	Negative PCR Control
Reconstituted mericon Assay (including primers and probe)	5 µl	5 µl	5 µl
Sample DNA & Water	5 µl	–	–
Dissolved Positive Control DNA	–	5 µl	–
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	–	–	5 µl
Total volume	10 µl	10 µl	10 µl

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش Real time PCR (Borges et al., 2019)

Table 2- Thermal program of Real time PCR reaction

مرحله Stage	درجه حرارت و مدت زمان Temperature and Time
Initial PCR activation step	95°C, 5 min
Denaturation دناتوراسیون	95°C, 15 Sec
Annealing اتصال پرایمرها	60°C, 15 Sec
Extension طویل‌سازی	72°C, 10 Sec

جدول ۳- مواد و حجم استفاده شده در واکنش PCR

Table 3- Materials and volume used in PCR reaction

Materials	Volume	طول قطعه PCR product *S. typhimurium*	طول قطعه PCR product *S.enteritidis*
Master mix	25 µl	107 bp	316 bp
DNA template	3 µl	_	_
Primers	2 µl	_	_
Nuclease free water	20 µl	_	_

واکنش PCR جهت تشخیص باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس*

واکنش‌ها در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت و هر واکنش شامل ۲۵ میکرولیتر Master mix ، ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگرها و۲۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود (جدول ۳). در این واکنش از نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰ استفاده شد. تشکیل باند در محدوده bp ۱۰۷ برای باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و همچنین تشکیل باند در محدوده bp ۳۱۶ برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* مورد انتظار می‌باشد. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. برنامه مورد استفاده PCR و نیز مشخصات پرایمرها نیز به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ درج شده است.

نتایج و بحث

نتایج استخراج DNA

متداول‌ترین تکنیک مورد استفاده برای شناسایی و تشخیص سالمونلا، تکنیک میکروبیولوژیکی سنتی است. علی‌رغم اینکه، این تکنیک دارای استاندارد طلایی می‌باشند، این روش‌ها معمولا پرزحمت و زمان‌بر بوده و حداقل نیازمند ۴ تا ۶ روز زمان هستند که باعث افزایش ریسک جذب یا انتقال پاتوژن‌ها می‌شود (Andrews and Hammack, 2003). تشخیص سریع، با هزینه موثر و اتوماتیک پاتوژن های غذا-زاد در طول زنجیره مواد غذایی، همچنان به‌عنوان نگرانی و دغدغه اصلی صنایع و سلامت عمومی ادامه دارد. به دلیل این

نیازمندی‌ها، PCR به یک ابزار قدرتمند در تشخیص‌های میکروبیولوژیکی در طول دهه اخیر تبدیل شده است (Sachse, 2003). نسل دوم متدولوژی های PCR، real-time PCR، توانایی برآورده کردن تمام این نیازها را، به‌وسیله تکثیر و کشف هم زمان، در یک واکنش یک مرحله‌ای در لوله بسته، دارد (Malorny et al., 2004).

جدول ٤- برنامه PCR

Table 4- PCR program

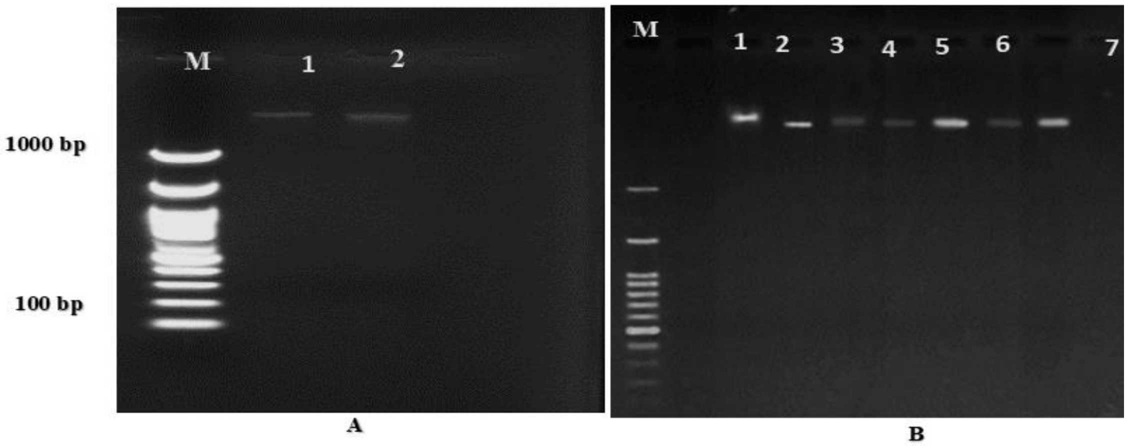
Steps	Temperature (°C)	Time	Cycle
دناتوراسیون اولیه Initial Denaturation	94	4 min	1
دناتوراسیون Denaturation	94	1 min	35
اتصال پرایمرها Annealing	62	30 sec	35
طویل‌سازی Extension	72	30 sec	35
طویل‌سازی نهایی Final extension	72	5 min	1

جدول ٥- توالی پرایمرهای باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (Ben Hassena *et al*., 2015) و *سالمونلا انتریتیدیس* (Paião *et al*., 2013) استفاده شده در PCR

Table 5- Primers sequences of *Salmonella typhimurium* (Ben Hassena et al., 2015) and *Salmonella enteritidis* (Paião et al., 2013) used in PCR

	Primer pair	Sequence (5′→3′)	TM	Length
Salmonella typhimurium	siiA Fw	ACGACTGGGATATGAACGGGGAA	64.7	23
	siiA Rv	TCGTTGTACTTGATGCTGCGGAG	64.7	23
Salmonella enteritidis	IE1 Fw	AGTGCCATACTTTTAATGAC	64	20
	IE1 Rv	ACTATGTCGATACGGTGGG	64	19

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و روش جدیدتر real-time PCR برای کشف سالمونلا یا سروتیپ‌های ویژه در برخی از مواد غذایی، توسعه یافته‌اند (Ferretti et al., 2001). چندین روش PCR، بوسیله هدف قرار دادن ژن‌های مختلف سالمونلا، از قبیل 16S rRNA (Iida et al., 1993)، agfA (Doran et al., 1993)، via B (Hashimoto et al., 1995) و ویرولانس مربوط به پلاسمیدها توسعه یافته‌اند (Mahon, and Lax, 1993). به‌نظر می‌رسد که برای کشف گونه‌های سالمونلا، روش PCR، نسبت به روش‌های سنتی کشت، برتری دارد. درحالیکه روش PCR، کشف سریع، حساس و ویژه پاتوژن ها را پیشنهاد می‌کند، ایراد اصلی این روش، عدم توانایی آن در ارزیابی زنده‌مانی سول‌ها، به دلیل حضور DNA در سلول‌های مرده می‌باشد، در صورتی که روش‌های مبتنی بر کشت، فقط سلول‌های زنده را کشف و شمارش می‌کند (Josephson et al., 1993). DNA استخراج شده از دو باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط در شکل ۱ (A)، قابل مشاهده است. DNA استخراج شده از بافت عضله سینه مرغ، کبد و سنگدان با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی و از رنگ safe stain برای مشاهده DNA استفاده شد (شکل ۱، B).



شکل ۱- (A) الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده از باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس*. ردیف M نشانگر وزنی DNA، ردیف ۱ باند DNA استخراج شده از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و ردیف ۲ باند DNA استخراج شده از باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* می‌باشد. (B): ردیف M نشانگر وزنی DNA، ردیف‌های ۱، ۲، ۳ باند DNA استخراج شده از بافت مرغ، ردیف‌های ٤ و ٥ باند DNA استخراج شده از بافت کبد و ردیف‌های ٦ و ۷ باند DNA استخراج شده از بافت سنگدان می‌باشد.

Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* bacteria. Row M indicates DNA Marker, row 1 is the DNA band extracted from *Salmonella typhimurium* bacteria, and row 2 is the DNA band extracted from *Salmonella Enteritidis* bacteria. (B): row M is the DNA weight marker, rows 1, 2, 3 are DNA bands extracted from chicken tissue, rows 4 and 5 are DNA bands extracted from liver tissue, and rows 6 and 7 are DNA bands extracted from bone tissue.

نتایج واکنش Real time PCR

روش real-time PCR تشخیصی، برای کشف و شناسایی اختصاصی سالمونلا در مواد غذایی، به‌عنوان یک ابزار سریع و موثق برای کنترل نمونه‌های آلوده شده در طول زنجیره تولید غذا، به‌طور فزاینده‌ای در حال استفاده است. برخی از روش‌های بر پایه real-time PCR برای شناسایی سالمونلا، قبلاً مورد توصیف قرار گرفته‌اند (Chen et al., 1997; Hoorfar et al., 2000; Knutsson et al., 2002). اکثر این آزمون‌ها به‌عنوان یک ابزار تشخیصی قابل کاربرد نمی‌باشند که این امر به دلیل فقدان یک کنترل داخلی تکثیر (IAC)[1] می‌باشد. یک روش PCR برای تشخیص سالمونلا، در مطالعات همکاری بین المللی، ارزیابی و تعیین اعتبار شد (Malorny et al., 2003). این آزمون یک قطعه ۲۸۴ جفت بازی از ژن *inv A* را تکثیر می‌کند و به دنبال آن الکتروفورز ژل آگاروز صورت می‌گیرد.

از تعداد ۴۵ نمونه که ۱۵ نمونه شامل بافت مرغ، ۱۵ نمونه شامل بافت کبد و ۱۵ نمونه مربوط به بافت سنگدان می‌باشد، نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که مجموعاً ۹ نمونه آلوده به جنس سالمونلا بودند (شکل ۲). از این ۹ نمونه، ۶ نمونه مربوط به بافت مرغ، ۲ نمونه مربوط به بافت کبد و ۱ نمونه مربوط به بافت سنگدان می باشد. این ۹ نمونه جهت تشخیص دو گونه *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* مورد PCR قرار گرفتند.

شناسایی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* به کمک واکنش PCR

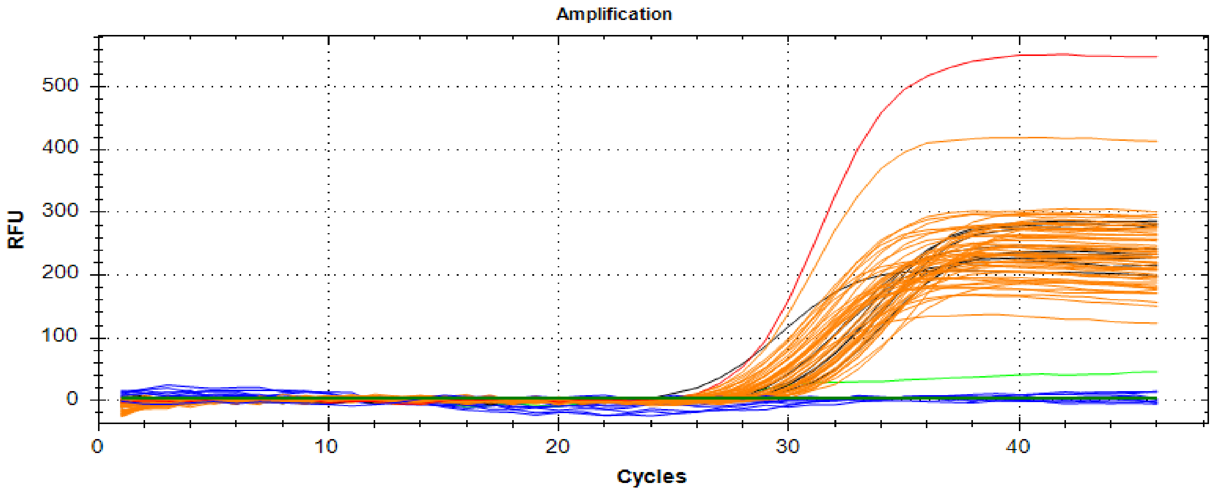
محصول PCR مربوط به ژن *siiA* باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از دستگاه Gel Documentation باند مورد نظر در محدوده ۱۰۷ bp رویت گردید. از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بوده و واجد ژن *siiA* می‌باشد که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به بافت مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد می‌باشد. از آنجایی که ژن *siiA* اختصاصی گونه *سالمونلا تیفی موریوم* می‌باشد (Ben Hassena et al., 2015). نتایج، تاییدی بر تشخیص گونه *سالمونلا تیفی موریوم* در این ۷ نمونه می‌باشد. محصول PCR ژن *siiA* دارای اندازه ۱۰۷ bp می‌باشد.

نتایج واکنش PCR جهت تشخیص باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*

محصول PCR ناشی از تکثیر ژن IE1 بعد از بررسی با دستگاه Gel Documentation، باندی در محدوده ۳۱۶ bp تشکیل داد. از تعداد ۹ نمونه که در آزمون Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۱ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* بوده که

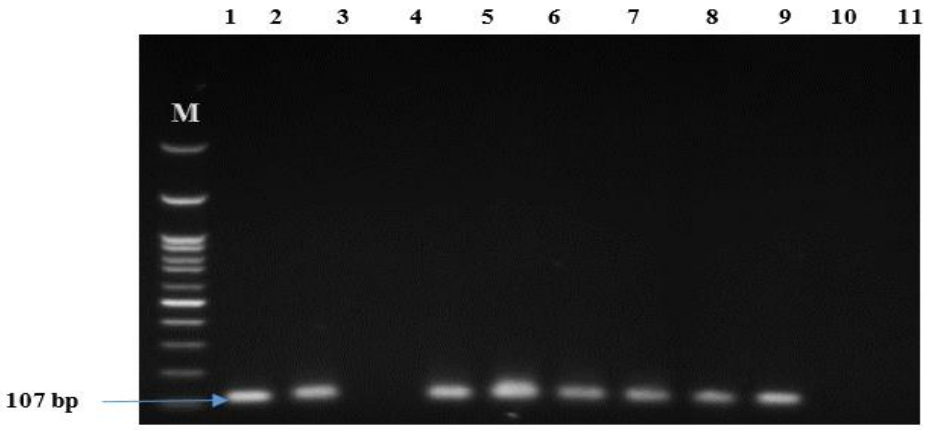
1 Internal amplification control

مربوط به بافت مرغ می باشد و تنها این ۱ نمونه واجد ژن IE1 می‌باشد. از آنجایی که ژن IE1 اختصاصی جنس سالمونلا می‌باشد (Paião et al., 2013). نتایج، تاییدی بر تشخیص جنس *سالمونلا انتریتیدیس* در این ۱ نمونه‌می‌باشد. محصول PCR ژن IE1 دارای اندازه ۳۱۶ bp می‌باشد. Riyaz-Ul- Hassan و همکاران (۲۰۰۴) روشی را برای کشف و شناسایی سریع سالمونلا به‌وسیله واکنش‌های زنجیره‌های پلی‌مراز پیشنهاد دادند. در این مطالعه، پرایمرها بر اساس ژن *stn* به‌منظور توسعه یک روش ویژه PCR برای کشف و شناسایی سالمونلا، استفاده شدند. ژن *stn* به‌طور وسیعی در گونه‌های جنس سالمونلا توزیع شده است. این ژن بر روی کروموزوم *سالمونلا تایفی موریوم* قرار گرفته است و حضور یک ژن *stn* سالم و دست نخورده، به‌طورقابل توجهی به خاصیت تهاجمی و ویرولانس سالمونلا، کمک می‌کند. این مطالب مبین و موید این است که علاوه بر ژن مورد استفاده در کار ما (*inv A*) ژن‌های دیگری هم استفاده شده است.



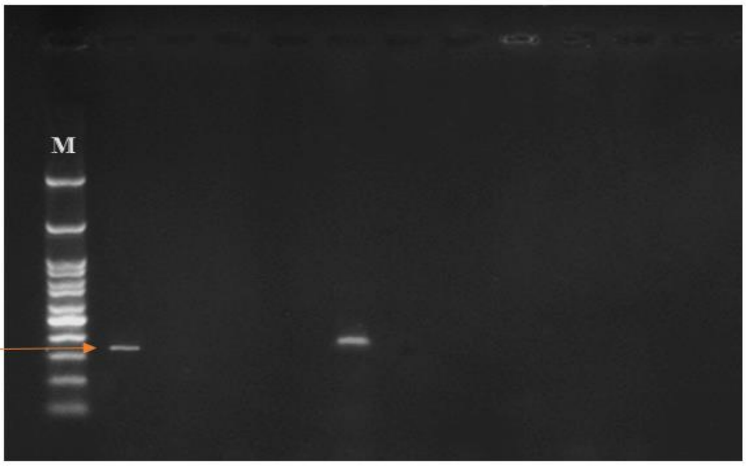
شکل ۲- منحنی تکثیر مربوط به کنترل منفی (سبز). کنترل مثبت (قرمز)، نمونه‌های دارای عدم آلودگی به سالمونلا (آبی)، نمونه‌های آلوده به سالمونلا (سیاه) و کنترل داخلی همه نمونه‌ها (نارنجی).

Fig. 2. Proliferation curve of the negative control (green). Positive control (red), Salmonella-free samples (blue), Salmonella-contaminated samples (black) and internal control of all samples (orange).



شکل ۳- شناسایی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*. ردیف M نشانگر وزنی DNA، (لدر ۱۰۰ bp بوده و شامل ۱۰ باند از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ می‌باشد.) ردیف ۱، کنترل مثبت (سویه *سالمونلا تیفی‌موریوم*)، ردیف‌های ۲، ٤، ٥، ٦، ۷، ۸ و ۹ نمونه‌های آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌باشد. ردیف ۳ و ۱۰ نمونه‌های عاری از آلودگی می‌باشند و ردیف ۱۱،کنترل منفی.

Fig. 3. Identification of *Salmonella typhimurium* bacteria. Lane M is the DNA weight Marker (the ladder is 100 bp and includes 10 bands from 100 to 1000). Lane 1, positive control (*Salmonella typhimurium* strain), Lanes 9, 8, 7, 6, 5, 4, 2 Samples are contaminated with *Salmonella typhimurium* bacteria. Lanes 3 and 10 are contamination-free samples, and Lane 11 is the negative control.



شکل ٤- شناسایی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*. ردیف M نشانگر وزنی DNA (لدر ۱۰۰bp بوده و از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ می‌باشد)، ردیف۱،کنترل مثبت (سویه *سالمونلا انتریتیدیس*)، ردیف ٥ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* می‌باشد. ردیف‌های ۲، ۳، ٤، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ نمونه‌های عاری از آلودگی می‌باشند و ردیف ۱۱، کنترل منفی.

Fig. 4. Identification of *Salmonella enteritidis* bacteria. Lane M is the weight Marker of DNA (the ladder is 100 bp and ranges from 100 to 1000), Lane 1 is the positive control (*Salmonella enteritidis* strain), Lane 5 is the sample contaminated with *Salmonella enteritidis* bacteria. Lanes 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 are contamination-free samples and Lane 11 is the negative control.

با توجه به اینکه جنس سالمونلا به‌عنوان یک پاتوژن غذایی و عامل بیماری‌های گوارشی همچون تب تیفوئید یا حصبه، منجر به کاهش کیفیت محصولات غذایی از طریق ایجاد الودگی مواد غذایی می‌شود. از این رو، شناسایی روش‌های سریع و کارآمد در شناسایی این جنس بسیار ضروری است. بنابراین، این تحقیق با هدف معرفی و تایید روش‌های PCR و real time PCR در شناسایی دو گونه بیماری‌زای سالمونلا شامل *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* در بافت حیوانی مرغ، کبد مرغ و سنگدان مرغ می‌باشد. با توجه به اینکه هر یک از باکتری‌های مذکور دارای یک ژن مارکر شامل ژن IE1 در *سالمونلا انتریتیدیس* (Paião et al., 2013) و ژن *siiA* در باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (Ben Hassena et al., 2015) می‌باشند. در این تکنیک‌ها از ژن‌های مذکور به‌عنوان نشانگر مولکولی استفاده گردید و از دو جفت پرایمر (siiA Fw ، siiA Rv ؛ IE1Fw ،IE1Rv) برای دو ژن، IE1 (Paião et al., 2013) و *siiA* (Ben Hassena et al., 2015) استفاده شد. قسمتی از ژن که توسط این پرایمرها تکثیر می شود، به‌ترتیب ۳۱۶ bp و۱۰۷ طول دارد. ژن IE1 جهت تشخیص جنس *سالمونلا انتریتیدیس* (Paião et al., 2013) و ژن *siiA* جهت تشخیص گونه *سالمونلا تیفی موریوم* (Ben Hassena et al., 2015) مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن جایی که انتخاب قطعه ژن و پرایمر مناسب و درجه حرارت مطلوب در مرحله annealing از پارامترهای موثر در سیکل تکثیری PCR است، لذا این دو ژن انتخاب گردیدند. بر اساس نتایج از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بوده و واجد ژن *siiA* می‌باشد، که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به بافت مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد، و یک مورد از نمونه‌های آلوده مربوط به ژن IE1 در *سالمونلا انتریتیدیس* می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، شناسایی بیان ژن‌های مذکور در بافت‌های سینه، کبد و سنگدان نشاندهنده این مطلب است که روش PCR و real time PCR می تواند به‌عنوان ابزاری مناسب در شناسایی این پاتوژن در بافت‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات اخیر نیز نشان‌دهنده این مطلب هستند که ترکیب تکنیک‌های PCR و تکنیک‌های مبتنی بر فلورسنس همچون real time PCR (qPCR) جهت شناسایی پاتوژن‌های غذایی ابزارهای بسیار مناسبی هستند (Rodríguez-Lázaro et al., 2013).

بی‌تردید یکی از دقیق‌ترین، حساس‌ترین و سریع‌ترین تکنیک‌های تشخیصی عوامل پاتوژن روش‌های مولکولی است (Bennet et al., 1998). یکی از رایج ترین روش‌های تشخیصی مولکولی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) است (Davis et al., 1998). این روش دارای بیشترین دقت، حساسیت و اختصاصی بودن و نیز سرعت می‌باشد چراکه اساس آن تشخیص DNA (قسمتی از ژن) است (D'Aoust and Purvis, 1998). با استفاده از این روش می‌توان چند ژن مورد نظر را در یک جنس و یا سویه باکتری تشخیص داد، علاوه بر آن می توان، همزمان چندگونه باکتری را تشخیص داد (Soradeghi Topkanlou et al., 2021). اساس این تکنیک تکثیر قسمتی از DNA با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی است. مزیت دیگر این

تکنیک عدم وابستگی PCR به بیان ژن است، زیرا در روش‌های بیوشیمیایی تغییرات فیزیکی ناشی از فعالیت‌های متابولیسمی عامل پاتوژن موجب می‌شود به وجود آنتی‌ژن و یاعامل بیماری‌زا پی برد و عدم تولید آنتی‌ژن در این روش دلالت بر عدم وجود عامل بیماری‌زا می‌کند، درصورتی که ممکن است عامل بیمارزا هنوز آنتی‌ژن تولید نکرده باشد (D’Aoust and Purvis, 1998). ژن‌های هدف متعددی جهت شناسایی برای سویه‌های سالمونلا معرفی گردیده است: RfbE, FliC, InvA, SpvC, Int, Flo (Cowden et al., 1989) تمامی این ژن‌ها را می‌توان با Nested PCR، Semi nested PCR و Multiplex PCR و سایر روش‌های PCR تکثیر کرد (Cowden et al., 1989).

نتیجه‌گیری

روش real-time PCR به‌عنوان یک روش سریع با امکان تشخیص هم زمان چندین عامل بیماری‌زا هم در زمینه‌های پزشکی و هم صنایع غذایی بسیار مورد توجه و استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق امکان تشخیص سریع و هم زمان باکتری فوق‌العاده بیماری‌زای منتقل شده از طریق مواد غذایی یعنی سالمونلا، با اختصاصیت و حساسیت بالا در سالمونلا و از مرغ بهینه‌سازی شد. نتایج حاصل از Real time PCR از مجموع ۴۵ نمونه، ۹ نمونه آلوده به جنس سالمونلا نشان داد. نتایج روش PCR معمولی نشان داد از تعداد ۹ نمونه مثبت در تست Real time PCR، بیشترین آلودگی به گونه *سالمونلا تیفی موریوم* بوده (۷ مورد از ۹ مورد) که از این ۷ نمونه، بیشترین آلودگی مربوط به سینه مرغ (۵ مورد) و ۲ مورد مربوط به کبد بودند. آلودگی به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* از تعداد ۹ نمونه، تنها یک نمونه آلوده بود که مربوط به سینه مرغ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و با گرنت شماره ۳/۴۶۵۸۷ انجام پذیرفت.

منابع

1. Alcamo, E. (1997): Fundamentals of microbiology. 5th edit. P: 235-238.
2. Andrews W. H and Hammack, T. S. “Chapter 5: Salmonella,” in (Food and Drug Administration) Bacteriological Analytical Manual Online, (2003), http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html.
3. Apfalter, P., Barousch, W., Nehr, M., Makristathis, A., Willinger, B., Rotter, M., & Hirschl, A. M. (2003). Comparison of a new quantitative ompA-based real-time PCR TaqMan assay for detection of Chlamydia pneumoniae DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, *41*(2), 592-600. https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.592-600.2003
4. Azizpour, A., Judri, S. (2018), investigating the prevalence of Salmonella serotypes in animal feed and their drug resistance to common antibiotics in medical centers. Comparative pathobiology, scientific research, year 16, spring, number 1, pp. 2758-2751. (In Persian)
5. Bejai Al-Zhaibi, A., Yahya Raiit, R., Neyri Fasai, B., Qalianchi Langroudi, A., Zahrai Salehi, T., (2018), identification and differentiation of serovars of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pleurum*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella* Dublin using Genome-specific multiplexing test. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. Volume 13, pp. 131-142. (In Persian)
6. Ben Hassena, A., Barkallah, M., Fendri, I., Grosset, N., Ben Neila, I., Gautier, M., Gdour, R. (2015). Real time PCR gene profiling and detection of Salmonella using a novel target: The *siiA* gene. *Journal of Microbiological Methods*. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.018
7. Bennet, A. R., Greenqood, D., Tannant, C., Banks, J. G., Betts, R. R. (1998). Rapid and definitive detection of salmonella in foods By PCR. Lett .*Appl.microbial*. 26 .437.441. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00368.x
8. Borges, K. A., Martelo, E. B., Dos Santos, L. A., Furian, T. Q., Cisco, I. C., Manto, L., & Dos Santos, L. R. (2019). Detection and quantification of Salmonella spp. in poultry slaughterhouses of southern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *13*(05), 455-460.
9. Boyd, E. F., Li, J., Ochman, H., & Selander, R. K. (1997). Comparative genetics of the inv-spa invasion gene complex of Salmonella enterica. Journal of Bacteriology, 179, 1985–1991. https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1985-1991.1997
10. Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., & Ge, B. (2011). Rapid detection of viable Salmonellae in produce by coupling *propidium monoazide* with loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4008–4016. https://doi.org/10.1128/AEM.00354-11
11. Chen, S., Yee, A., Griffiths, M., Larkin, C., Yamashiro, C. T., Behari, R., .. & Stephanie, A. (1997). The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of Salmonella species in food commodities. *International journal of food microbiology*, 35(3), 239-250.

12. Cheng, C. M., Lin, W., Van, K. T., Phan, L., Tran, N. N., & Farmer, D. (2008). Rapid detection of Salmonella in foods using real-time PCR. *Journal of food protection*, 71(12), 2436-2441.
13. Cowden, J. M., O'mahony, M., Bartlett, C. L. R., Rana, B., Smyth, B., Lynch, D., ... & Kilsby, D. C. (1989). A national outbreak of Salmonella typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiology & Infection*, 103(2), 219-225. https://doi.org/10.1017/S0950268800030569
14. D'Aoust, J.Y and Purvis, U. (1998). Isolation an identification of salmonella from foods. MFHPB-20. Health Protection Branch, Health Canada, Ottawa, Canada. p:145-230.
15. Davis, R. H., Nicholas, R. A,. Mclaren, L. M., Corkish ,J. D., Laning, D, G., Wary, C. (1998). Bacteriologcal and serological investigation of persistent *Salmonella enteritidis* infection in an integrated poultry organization. Vet. *Microb*. 58(2-4):277-293. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00157-0
16. Doran, J. L., Collinson, S. K., Burian, J., Sarlos, G., Todd, E. C., Munro, C. K., ... & Kay, W. W. (1993). DNA-based diagnostic tests for Salmonella species targeting agfA, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *Journal of clinical microbiology*, 31(9), 2263-2273. https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2263-2273.1993
17. EC, C. R. (2005). Microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 338, 1-29.
18. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and, & Control). (2015). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne. *EFSA Journal*, 13(1), 162.
19. Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G., & Clementi, F. (2001). Twelve-hour PCR-based method for detection of Salmonella spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 977-978. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.977-978.2001
20. Galán, J. E., & Curtiss 3rd, R. (1991). Distribution of the invA,-B,-C, and-D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella serovars*: invA mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity*, *59*(9), 2901-2908. https://doi.org/10.1128/iai.59.9.2901-2908.1991.
21. Hashimoto, Y., Itho, Y., Fujinaga, Y., Khan, A. Q., Sultana, F., Miyake, M., ... & Ezaki, T. (1995). Development of nested PCR based on the ViaB sequence to detect *Salmonella typhi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 775-777. https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.775-777.1995.
22. Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådstrom, P. (2000). Automated 5′ nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), 3429-3435.
23. Iida, K., Abe, A., Matsui, H., Danbara, H., Wakayama, S., & Kawahara, K. (1993). Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella strains* using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization. *FEMS microbiology letters*, 114(2), 167-172. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06568.x.
24. Josephson, K. L., Gerba, C. P., & Pepper, I. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3513-3515. https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3513-3515.1993
25. Knutsson, R., Löfström, C., Grage, H., Hoorfar, J., & Rådström, P. (2002). Modeling of 5′ nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for Salmonella enterica. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 52-60. https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.52-60.2002
26. Kurowski, P. B., Traub-Dargatz, J. L., Morley, P. S., & Gentry-Weeks, C. R. (2002). Detection of Salmonella spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. *American journal of veterinary research*, 63(9), 1265-1268.
27. Le Minor, L. (1981).The Genus salmonella, In M.P.Stolp(ed), The Prokaryotes Springer-Verlag,New York, N. Y. P:1148-1156.
28. Liljebjelke, K. A., Hofacre, C. L., Liu, T., White, D. G., Ayers, S., Young, S., & Maurer, J. J. (2005). Vertical and horizontal transmission of Salmonella within integrated broiler production system. *Food borne Pathogens & Disease*, 2(1), 90-102. https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.90
29. Mahon, J., & Lax, A. J. (1993). A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the spvR gene. *Epidemiology & Infection*, 111(3), 455-464. https://doi.org/10.1017/S0950268800057186.
30. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., & Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 290-296. https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003
31. Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., ... & Helmuth, R. (2003). Interlaboratory diagnostic accuracy of a Salmonella specific PCR-based method. *International journal of food microbiology*, 89(2-3), 241-249. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00154-5.
32. Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7046-7052. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7046-7052.2004

33. McGuinness, S., Barry, T., & O'Grady, J. (2010). Development and preliminary validation of a real-time RT-PCR based method targeting tmRNA for the rapid and specific detection of Salmonella. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2010.08.012.
34. Moghadam, A., Nazarian, Sh., Amani, J. 2017. Identification and investigation of *Salmonella Typhimurium*, Infantis and Enteritidis serotypes in clinical samples from medical centers in Kerman province. Iranian Journal of Medical Microbiology, 11(2), pp. 1-8. (In Persian).
35. Momtaz H, Ghaedamini M, Momeni M. Detection of virulence factors in *Salmonella typhimurium* and Salmonella enteritidis serotypes isolated from chicken meat in Chaharmahal va Bakhtiari Province of Iran. *J food Microbiol*. 2014; 1(1): 17-22.
36. Monadi, M., Kargar, M., Naghiha, A., and Mohammadi, R. 2012. Determining *Salmonella contamination* of native eggs in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad provinces using PCR technique and evaluating drug resistance. Armaghane Danesh, 19(2), pp. 179-187. (In Persian).
37. Morsali, H., Asaadi, H., Yazdansetad, S., & Najafpour, R. (2017). Optimization of a Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Foodborne Pathogens Salmonella spp. and *Escherichia coli* O157: H7 and Contamination Prevalence Assay in Meat Products. Journal of Arak University of Medical Sciences, 20(6), 83-93.
38. Mortazavi, A., Kashani-nejad, M., Zia-ul-Haq, S. H. 1993. Food Microbiology. pp. 184 to 185. (In Persian).
39. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. Clinica chimica acta, 439, 231-250. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017
40. Paião F.G, ArisitidesI L.G.A, MurateI L.S, Vilas-BôasII G.T, Vilas-BoasII L.A., ShimokomakiI M. 2013.Detection of Salmonella spp, *Salmonella Enteritidis* and *Typhimurium* in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Brazilian Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000002
41. Rad, M; Kalidri, Gh; Kurdjezi, Sh. Identification of different species of Salmonella in the center of domestic chicken breeding. Research and construction. 2008, period 21, number 4. pp. 87 to 93. (In Persian)
42. Riyaz-Ul-Hassan, S., Verma, V., & Qazi, G. N. (2004). Rapid detection of Salmonella by polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes*, 18(5), 333-339. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.05.003
43. Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., & Hernández, M. (2013). Real-time PCR in food science: PCR diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, *15*(2), 39-44. https://doi.org/10.21775/cimb.015.039
44. Sachse, K. 2003. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. Methods Mol. Biol. 216:3–29. https://doi.org/10.1385/1-59259-344-5:03
45. Saroj. SD, Shashidhar. R, Karani. M, Bandekar. JR, Rapid, sensitive, and validated method for detection of Salmonella in food by an enrichment broth culture - nested PCR combination assay. *Mol Cell Probes*. 2008; 22(3): 201-6. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.02.002
46. Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., ... & Messadi-Akrout, F. (2017). Screening and detecting Salmonella in different food matrices in Southern Tunisia using a combined enrichment/real-time PCR method: correlation with conventional culture method. *Frontiers in microbiology*, 8, 2416. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02416
47. Soradeghi Topkanlou, A., Shahidi, F., Javadmanesh, A., Mortazavi, A., Veridi, M., J., Roshank, S. 2021. Isolation and identification of microbial agents causing yellow spot in chicken sausage by culture and molecular methods. Iranian journal of food science and industry. 18 (114): pp. 1 to 14. (In Persian)
48. Vichaibun, V., & Kanchanaphum, P. (2020). Quantitative LAMP and PCR Detection of Salmonella in Chicken Samples Collected from Local Markets around Pathum Thani Province, Thailand. *International journal of food science*, 8833173. https://doi.org/10.1155/2020/8833173
49. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley E. (2002). The prevalence and PCR detection of *Salmonella contamination* in raw poultry. Vet Microbiol. 2;89(1):53-60. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00160-8
50. Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., & Li, B. (2016). Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. Frontiers in microbiology, 7, 1833. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833